

⑯公開特許公報(A) 平2-117384

⑯Int.Cl.⁵C 12 N 15/14
1/19
C 12 P 21/02

識別記号

ZNA

庁内整理番号

7421-4B
8214-4B
8717-4B

⑯公開 平成2年(1990)5月1日

C 12 N 15/00

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全27頁)

A※

⑯発明の名称 酵母宿主によるヒト血清アルブミンAの製造

⑯特 願 昭63-268302

⑯出 願 昭63(1988)10月26日

⑯発明者 鈴木 正則 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東亞燃料工業株式会社総合研究所内

⑯発明者 八木 慎太郎 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東亞燃料工業株式会社総合研究所内

⑯発明者 楓 昇 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東亞燃料工業株式会社総合研究所内

⑯出願人 東亞燃料工業株式会社 東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号

⑯代理人 弁理士 青木 朗 外4名

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

酵母宿主によるヒト血清アルブミンAの

製造

2. 特許請求の範囲

1. ヒト血清アルブミンAのプレプロ配列を酵母により効率的に翻訳されるコドンによりコードしているリーダー配列と該リーダー配列の下流に存在するヒト血清アルブミンAをコードするcDNAとを有するDNA。

2. ヒト血清アルブミンAをコードするcDNAと該cDNAの下流に存在するポリ(A)配列とを有するDNA。

3. ヒト血清アルブミンAのプレプロ配列を酵母により多用されるコドンによりコードしているリーダー配列、ヒト血清アルブミンAをコードするcDNA、及びポリ(A)配列をこの順序で有するDNA。

4. 前記リーダー配列が次の式:

ATG AAG TGG GTT ACT TTC ATC TCT TTG TTG
TAC TTC ACC CAA TGA AAG TAG AGA AAC AAC
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu

TTC TTG TTC TCT TCT GCT TAC TCT AGA CGT
AAG AAC AAG AGA AGA CGA ATG AGA TCT CCA
Phe Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly

GTT TTC AGA CGC
CAA AAG TCT GCG
Val Phe Arg Arg

で表わされる、請求項1又は2に記載のDNA。

5. 酵母で機能し得るプロモーターとターミネーターとの間に請求項3に記載のDNAが発現可能な方向に挿入されている発現プラスミド。

6. 請求項5に記載の発現プラスミドにより形質転換された酵母。

7. 請求項6に記載の酵母を培養し、成熟ヒト血清アルブミンAを産生・分泌せしめ、これを採取することを特徴とする成熟ヒト血清アルブミンAの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は成熟ヒト血清アルブミンAの酵母によ

る製造方法、及びそのための遺伝子系に関する。この方法によれば成熟型のヒト血清アルブミンAが細胞外に分泌されるため、その回収・精製が簡単となり、工業的製造のために極めて好ましい。

〔従来の技術〕

今まで、遺伝子工学的方法によりヒト血清アルブミンを製造するための方法として、大腸菌を用いる方法 (Lawn 等、*Nucleic Acids Res.* 9, 6103-6114, 1981; Latta等、*Biotechnology* 5, 1309-1314, (1987) ; 特開昭58-150517) 、枯草菌を用いる方法 (Saunders等、*J. Bacteriol.* 169, 2917-2925, (1987)) 、及び酵母を用いる方法 (Elcheverry等、*Biotechnology* 4, 726-730, (1986)) が知られている。しかしながら、これらの方法により製造される血清アルブミンは正常なヒト血清アルブミンとはアミノ酸配列を幾分異にし、また生産された血清アルブミンは不溶化沈澱となり、シグナルペプチドのプロセシング効率が低い、細胞外への分泌が困難である、等の問題点を有す

ると報告されている。

〔発明が解決しようとする課題〕

従って、本発明は成熟ヒト血清アルブミンAを可溶性の形で、且つ天然血清アルブミンAと同じ立体構造において細胞外に分泌せしめ、これによって回収・精製を容易にすることにより大量のヒト血清アルブミンを工業的に製造することができる方法を提供しようとするものである。

〔課題を解決するための手段〕

上記の目的を達成するため、本発明は (1) ヒト血清アルブミンAのプレプロ配列を酵母により効率的に翻訳されるコドンによりコードしているリーダー配列と該リーダー配列の下流に存在するヒト血清アルブミンAをコードするcDNAとを有するDNA; (2) ヒト血清アルブミンAをコードするcDNAと該cDNAの下流に存在するポリ(A)配列とを有するDNA; (3) ヒト血清アルブミンAのプレプロ配列を酵母により多用されるコドン

によりコードしているリーダー配列、ヒト血清アルブミンAをコードするcDNA、及びポリ(A)配列をこの順序で有するDNA: (4) 酵母で機能し得るプロモーターとターミネーターとの間に前記(3)に記載のDNAが発現可能な方向に挿入されている発現プラスマミド; (5) 前記(4)に記載の発現ベクターにより形質転換された酵母; 及び(6) 前記(5)に記載の酵母を培養し、成熟ヒト血清アルブミンAを産生・分泌せしめ、これを採取することを特徴とする成熟ヒト血清アルブミンAの製造方法を提供する。

〔具体的な記載〕

1. 遺伝子系

宿主

正常ヒト血清アルブミンは分子内に多くのジスルフィド結合を含有しており、組換えDNA法によって天然物と同じ立体構造を有する正常ヒト血清アルブミンを製造するには、これらのジスルフィド結合が生産宿主細胞中で正しく形成されることが必須である。正常な立体構造の形成にはプロ

テインジスルフィドイソメラーゼ、ペプチジルプロリルcis-transイソメラーゼ等の酵素が関与していることが最近明らかになり、多数のS-S結合を有し複雑な立体構造をとる蛋白質を殆ど含まない大腸菌や枯草菌のような原核生物細胞では、とえあってもこのような立体構造形成(フォールディング)関連酵素系の働きは強くないことが予想される。一方、ヒトをはじめとする真核高等生物の細胞は数多くの複雑な高次構造を有する蛋白質(糖蛋白質や他の修飾蛋白質も含む)を細胞外に分泌することが知られているが、下等真核微生物である酵母でも、哺乳動物の細胞で蛋白質が分泌されるのと非常によく似た経路により蛋白質が分泌されることが知られている (Huffaker, T.C. and Robbins, P.W.J. *Biol. Chem.* 257, 3203-3210 (1982); Snider, M.D. in Ginsburg, V. & Robbins, P.W. (eds.) *Biology of Carbohydrates*, Vol. 2, Wiley, New York, (1984), pp. 163-198)。このため異種生物由来(特に哺乳動物)の遺伝子(主としてcDNA)を酵母宿内で発現させ遺伝子産物である

蛋白質を、細胞外に分泌せしめようとする実験が最近多く試みられてきた。たとえばヒトインクーフェロン α_1 , α_2 , τ [Hitzeman, R.A., Leung, D.W., Perry, L.J., Kahr, W.J., Levine, H.L., Goeddel, D.V. *Science* 219, 620-625 (1983)]、仔ウシプロキモシン [Smith, R.A., Duncan, M.J., Mair, D.T. *Science* 229, 1219-1224 (1985)]、ヒト上皮成長因子 [Brake, A.J., Merryweather, J.P., Coil, D.G., Heberlein, U.A., Masiarz, P.R., Mullenbach, G.T., Urdea, M.S., Valenzuela, P., Barr, P.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 4642-4646 (1984)]、マウスインターロイキン2 [Miyajima, A., Bond, M.W., Otsu, K., Arai, K., Arai, N. *Gene* 37, 155-161 (1985)]、ヒト β -エンドルフィン [Bitter, G.A., Chen, K.K., Banks, A.R., Lai, P.-H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5530-5534 (1984)]などで酵母菌による細胞外分泌が報告されているが、その分泌効率はマウスインターロイキン2の約80%からヒトインクーフェロンの4~10%まで目的とする蛋白質によりかなりの差がある。又、これらのうちその蛋白

質自身のシグナルペプチドを用いて細胞内輸送を試み、そのシグナルペプチドがうまく切断されて分泌することに成功しているものはヒトインクーフェロンである。その他のものは酵母インベルターゼ(SUC 2)のシグナルペプチドや接合因子 $\alpha 1$ (MP $\alpha 1$)のシグナル配列など酵母の蛋白質の細胞内輸送に必要なシグナル配列を目的とする成熟蛋白質に直接融合した形で発現させ、細胞内輸送を行わせたものである。さらに正しい位置でプロセシングを受けてることが明らかなものは少なく、ヒトインクーフェロンの場合は約半分が正しいプロセシングを受けているが、ヒト β -エンドルフィンではペプチド内部でも切断を受けている。

酵母菌を宿主として用いる遺伝子工学的物質生産系の特徴としては以下のようなものがある。

1. 大量高密度培養による発酵生産が容易かつ経済的である。また動植物の培養細胞系と比較して厳密に管理制御された培養装置を特別必要としない。

2. 発酵生産に多くの経験が蓄積されている。

3. 分子遺伝学的な知識が急速に蓄積されつつある。

4. 外来性の遺伝物質を細胞内及びゲノム内に取り込ませることが容易である。

5. 蛋白質の細胞内輸送及び、細胞外分泌の遺伝学及び生理学に対する理解が急速に高まっている。

6. 適切なプラスミドベクターを選択すれば、外来性の遺伝子をエピソーム状態 (YEP系プラスミド使用)、ゲノムに組み込ませた状態 (Y1pプラスミド使用)、酵母のセントロメアを含み細胞分裂に伴い染色体DNAとともに複製できる状態 (YCPプラスミド使用)、及び酵母の自律複製配列 (ARS) を含み自律的に複製できる状態 (YRpプラスミド使用) の4種の状態におくことができる。

7. シグナルペプチドやプロ配列などの細胞内プロセシング機能がある。

8. 酵母菌で合成される糖蛋白質に見い出される糖鎖は高等動植物の糖蛋白質における複合型糖

鎖とは異なる高マンノース型糖鎖ではあるが、酵母菌の小胞体で起こるコア糖鎖の付加は高等動物と共通した過程であり、両者における相違は外側の糖鎖の付加に見られるのみである。

9. ビタミン、微量因子等の添加により完全合成培地で形質転換体を生育させることができる。

10. 純粋なグルコースでなく粗製の糖源を利用しても形質転換体を生育させることができる。

この様な背景に基づいて、本発明においては酵母を宿主として使用する。

(プレプロ配列)

ヒト血清アルブミンを酵母細胞中で発現せしめ、これを効率よく分泌せしめるためには、成熟ヒト血清アルブミンのN-末端にプレプロ配列が存在する必要がある。また、このプレプロ配列は目的蛋白質の分泌の際に切除されて該目的蛋白質が成熟型で分泌される必要がある。このため本発明においては、この様な条件を満たすプレプロ配列としてヒト血清アルブミンの本来のプレプロ配列を使用する。

酵母における蛋白質の発現を増強するためには該蛋白質のN-末端領域をコードするコドンとして、酵母中で効率よく翻訳されるコドンを使用するのが好ましい。このため、本発明においては、前記プレプロ配列をコードするDNA配列として、酵母において効率よく発現される遺伝子において高頻度で使用されるコドンから構成される合成DNA配列を使用する。この様なコドンとして例えば次のコドンを用いる。

Lys=AAG	Trp=TGG	Val=GTT	Thr=ACT
Phe=TTC	Ile=ATC	Ser=TCT	Leu=TTG
Ala=GCT	Tyr=TAC	Arg=AGA	Gly=GGT

プレプロ配列をコードするDNA部分の一例として次の配列を用いることができる。

AA TTC ATG AAG TGG GTT ACT TTC ATC TCT TTG
G TAC TTC ACC CAA TGA AAG TAG AGA AAC
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu

→
EcoR I

TTG TTC TTG TTC TCT TCT GCT TAC TCT AGA
AAC AAG AAC AAG AGA AGA CGA ATG AGA TCT
Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser Arg

GGT GTT TTC AGA CG
CCA CAA AAG TCT GCG C
Gly Val Phe Arg Arg

ポリA配列及びAATAAAシグナル

コード配列の3'ー末端の下流に存在するポリA配列及びAATAAAシグナルが真核生物のmRNAの安定性に寄与すると言われている (Bergmann及びBrawerman Biochemistry, 16, 259-264 (1977); Huezら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 908-911 (1981))。従って、本発明の好ましい態様においては、ヒト血清アルブミンAをコードするcDNAの下流にこれらの配列を配証する。ポリA配列及びAATAAAシグナルとしては、例えばヒト血清アルブミンAcDNAに自然に付随しているこれらの配列を使用することができる。これらの配列を含有するヒト血清アルブミンA遺伝子はすでにクローニングされており、特願昭63-037453に記載されている。これらの配列の供給源として例えば λ gt 11 (λSA-1A)を使用することができ、その作製方法を参考例において後記する。

プロモーター

本発明においては、酵母細胞中で機能するものであればいずれのプロモーターを使用することも

上記の配列のN-末端のMetのコドンの上流にはEcoR I 粘着末端が設けられており、この制限酵素部位により上記配列はベクターに挿入される。また、上記プレプロ配列のC-末端のArgのコドンとしては、酵母での翻訳のために好ましいとして上記したコドンではなく、CCCが採用されており、これにより5'ー末端をCla Iにより切断した成熟ヒト血清アルブミン遺伝子と連結することができる。

ヒト血清アルブミンA遺伝子

ヒト血清アルブミンAをコードする遺伝子(cDNA)はすでにクローニングされており、その塩基配列及び該塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、特願昭63-037453に詳細に記載されている。従って本発明においては、このcDNAを含有するプラスミドpUC・HSA・CII等をヒト血清アルブミンAをコードする遺伝子の供給源として使用することができる。なお、これらのプラスミドの作製方法を参考例として後記する。

できる。しかしながら本発明においては誘導可能なプロモーターではなく構成的プロモーターを使用するのが好ましい。誘導可能なプロモーターを使用して誘導操作を行った場合にはヒト血清アルブミンが細胞内に急速に蓄積し、分子間ジスルフィド結合が形成されて非天然型の立体構造を有する分子が生成する可能性があるからである。

弱い誘発性を示すか又は構成性の酵母プロモーターの内、強力な活性を持つものとしては、例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH I) プロモーター、グリセラルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAP) プロモーター、及びグリセリン酸リン酸キナーゼ (GCK) プロモーターがあり、本発明においては、ADH I プロモーターを例にとって具体的に説明する。

酵母 ADH I 遺伝子 (ADC 1) を含む約2,100 塩基対の領域の塩基配列が既に決定されており、ADH I をコードする約1,100 塩基対の配列の他に 750 塩基対の5'側非翻訳配列と 320 塩基対の3'側非翻訳配列が判明している (Bennetzen, J. および

Hall, B. J. Biol. Chem. 257, 3018-3025(1982)。転写において RNA ポリメラーゼによる認識配列と考えられている Goldberg-Hogness ボックス (TATA ボックス) は翻訳開始コドン A T G の 128 基上流 (-128 の位置) にあり、ADH1 プロモーター活性は -410 の位置にある Sph I 認識部位より上流を欠失させても失われないといわれている (Beier 及び Young, Nature 300, 724-728(1982))。ADH1 プロモーターによる転写物は通常の酵母菌で全ポリ(A) RNA の少なくとも 1% に達する (Amerer, G. Methods Enzymol. 101, 192-201(1983))。

ターミネーター

転写における読み越し (read-through) により遺伝子生成物の量が減少する例が報告されている (例えば, Zaret, K. S. 及び Sherman, F., Cell 28, 563-573, (1982))。この現象を防止するためには発現されるべき構造遺伝子の下流にターミネーターを設けるのが好ましい。酵母ターミネーターを外来遺伝子の下流に配置し、遺伝子の発現を上昇させた例としてはたとえば PGK プロモーター/

ターミネーターからなるサンドイッチベクターを用いて子牛キモシンを発現させた実験があり、ターミネーターの導入により数倍～十倍程度の発現上昇が報告されている (Mellor, Gene 24, 1-14 (1983))。このような目的のためのターミネーターとしてはさまざまな遺伝子由来のものが使用でき、たとえば TRP5 (トリプトファン合成酵素) 遺伝子や CYC1 (イソ-1-チトクローム C) 遺伝子などのターミネーターが利用されている。強力なプロモーターが関与する転写の場合、リードスルーを防ぐために強力なターミネーターがその下流に配置されている方が発現の制御に好都合と考えられる。このため本発明においては例えば強力なプロモーターを有する遺伝子のターミネーターである ADH1 ターミネーター、CAP ターミネーター等を用いるのが好ましい。

ベクター要素

以上、本発明の発現プラスミド中に含有される、発現に直接関連する要素について説明したが、本発明の発現プラスミドは、さらに、酵母複製起点

及び標識遺伝子を含有しなければならない。酵母複製起点としては、例えば酵母由来の 2 μm プラスミド DNA の複製起点等を使用することができる。標識遺伝子としては、宿主に薬剤耐性を付与する遺伝子、宿主の栄養要求性を補完する遺伝子等、常用の標識遺伝子を用いることができる。さらに、プラスミドの組換え操作の際にプラスミドの複製を大腸菌中で行わせる必要があるため、本発明のプラスミドは大腸菌複製起点及び標識遺伝子を含有するシャトルベクターであることが好ましい。この様な、シャトルベクターとしての基本的要件を備えたベクターとして市販のプラスミド pJDB 207 等を用いることができる。このプラスミド pJDB 207 中の酵母標識遺伝子は、ロイシン生合成酵素である β-イソプロビルリンゴ酸脱水素酵素をコードする LEU2 遺伝子である。

発現プラスミド

従って本発明の好ましい発現プラスミドにおいては、酵母複製起点及び標識遺伝子並びに大腸菌複製起点及び標識遺伝子を含んでなるシャトルベ

クターに、プロモーター、プレプロ配列をコードするリーグー配列が連結されたヒト血清アルブミン A をコードする遺伝子、ポリ A 配列及びターミネーターがこの順序で挿入されている。

2 形質転換

本発明のプラスミドによる宿主酵母の形質転換は常法に従って行うことができる、その具体例を実施例 9 に記載する。

3 酵母の培養及びヒト血清アルブミンの回収

ヒト血清アルブミン cDNA を含んだ発現プラスミドにより形質転換された宿主酵母は通常の酵母の培養法により培養できる。たとえばYPD のような天然完全培地や SD 培地に 1% の酵母エキスを加えたような不完全合成培地でも培養できる。

培養後細胞外に分泌されたヒト血清アルブミンの回収は種々の方法で可能である。エタノール、アセトン、硫酸アンモニウムなどによる分別沈殿、等電点沈殿、限外ろ過などによる濃縮及び部分精製を行った後に各種クロマトグラフィーや上記部分精製法を組み合わせれば高濃度に分泌ヒト血清ア

ルブミンが精製されることが期待できる。

次に、実施例により、この発明をさらに具体的に説明する。以下の実施例において、特にことわらない限り、酵素反応は次の条件下で行った。

EcoR I (ニッポンジーン: 1.2 ユニット/ μ l)、Cla I (ニューイングランドバイオラブス: 5 ユニット/ μ l)、Hind III (ニッポンジーン: 1.2 ユニット/ μ l)、Xba I (宝酒造: 1.2 ユニット/ μ l)、及びBamH I (ニッポンジーン: 3.5 ユニット/ μ l)によるDNAの消化: DNA 1 μ g、酵素 1 μ l、及び 1.0 X EcoR I 緩衝液 (1 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM MgCl₂、500 mM NaCl) 3 μ lに滅菌蒸留水を加えて 30 μ lとする。37°C、1 時間保温して切断を完了させる。Sal I (ニッポンジーン、1.5 ユニット/ μ l) の場合は 1.0 X EcoR I 緩衝液の代わりに 100 mM Tris-HCl (pH 7.5)、7.0 mM MgCl₂、1.75 mM NaCl、7.0 mM 2-メルカプトエタノール、2 mM EDTA、0.1% ウシ血清アルブミンを使用する。

バクテリアアルカリ性ホスファターゼ処理: DNA 1 μ g、制限酵素 EcoR I 及び Hind III 各々 1 μ l 及

び 1.0 X EcoR I 緩衝液 2 μ l に滅菌蒸留水を加えて 20 μ l とし、37°C で 1 時間保温した後、90°C、5 分間加热して酵素を失活させる。次に滅菌蒸留水 3.8 μ l、バクテリアアルカリ性ホスファターゼ 2 μ l (宝酒造 0.5 ユニット/ μ l) を加えて 37°C、1 時間保温した後、フェノール抽出を行い、得られた水層をエタノール沈殿に用いる。

T4DNA リガーゼ処理: たとえばベクターDNA 1 μ g、ベクターDNAと等モル量のDNAフラグメント、1.0 X リガーゼ緩衝液 (660 mM Tris-HCl (pH 7.5)、6.6 mM MgCl₂、100 mM ジチオスライトール、1 mM ATP) 3 μ l 及び T4DNA リガーゼ 1 μ l (宝酒造、約 400 ユニット/ μ l) に滅菌蒸留水を加えて 30 μ l とし 16°C で一晩保温する。

合成フラグメントのT4ポリスクレオチドキナーゼによる5' -リン酸化: 5.0 mM Tris-HCl (pH 7.6)、1.0 mM MgCl₂、5 mM ジチオスライトール、0.2 mM ATP を含有する溶液 (2.5 μ l) 中で DNA フラグメントの各々の分量 (約 3.0 pmoles) を 6 ユニットの T4 ポリスクレオチドキナーゼ

(宝酒造) で 37°C、60 分間処理することにより 5' 端をリン酸化する。リン酸化されたフラグメントを含む溶液を混ぜ (計 100 μ l) 100°C の水浴に 5 分間放置した後室温で放冷しアニーリングを行う。2 μ l の T4DNA リガーゼを加え 16°C で一晩保温し、フラグメント間を連結し、二本鎖フラグメントとする。

大腸菌DNAポリメラーゼI反応: DNA 1 μ g、DNAポリメラーゼI (Klenow フラグメント、宝酒造 3.5 ユニット/ μ l) 1 μ l、1 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, TTP の混合物) 1 μ l 及び 1.0 X 缓衝液 (7.0 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 7.0 mM MgCl₂) 3 μ l に滅菌蒸留水を加えて全量を 30 μ l とし、37°C で 30 分間保温する。

プローブの標識:

1 μ g の合成DNA、5.0 μ Ci の γ -³²P-ATP 水溶液 (3000 Ci/mmol)、(5.0 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1.0 mM MgCl₂、5 mM DTT、1.0 ユニット T4 ポリスクレオチドキナーゼ (宝酒造) を含む 1.0 μ l の溶液を 37°C で 1 時間反応後、未反応の

スクレオチドを Nick-column (ファルマシア) を用い、メーカーのプロトコールにのっとり除き、³²P で標識されたDNAを得る (1 \times 10⁶ cpm/1 μ g DNA/400 μ l)。

ハイブリダイゼーション:

DNAを固定した膜をハイブリダイゼーション液 (6 \times SSC (1 \times SSC は 0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH 7.0)、5 \times デンハート液 (0.1% ウシ血清アルブミン、0.1% フィコール、0.1% ポリビニルビロリドン)、0.5% SDS、100 μ g 変性サケ精子DNA) 1.0 μ l 中で、42°C、3 時間保温する。液を捨て、プローブを 1 \times 10⁶ cpm/ μ l 加えたハイブリダイゼーション液 1.0 μ l を加え、80°C、3 分保温する。次に、42°C で一夜保温する。液を捨て、膜を 2 \times SSC により室温で 5 分洗い、さらに 2 \times SSC により 60°C で 30 分洗う。

なお、酵素反応によりプラスミドを作製する場合には、その酵素反応混合物を用いて大腸菌 HB101 を常法に従って形質転換し、大腸菌標識遺伝子に

依存して適切な常法により形質転換体を選択し、目的とするプラスミドを含有するクローンを例えればミニプレバレーション法により形質転換体から抽出したDNAを種々の制限酵素で切断して電気泳動法により分析する方法(たとえば Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J. Molecular cloning A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory 1982)により選択した。そして選択されたクローンを培養し、菌体から常法に従ってプラスミドDNAを抽出することにより、所望の組換えプラスミドを増幅・回収した。この方法は組換え操作の各段階により必要に応じて行った。

実施例1. プレプロ配列をコードするDNAの合成

次の配列を有する4種類のオリゴスクレオチド：

1. AATTCAATGAAGTGGGTTACTTTCATCTCTTTCTTCTT
2. AGAACAGAACAAACAAAGAGATGAAAGTAACCCACTTCATG
3. CTTGTTCTCTCTGCTTACTCTAGAGGTGTTTCAGAGC
4. CGCGTCTGAAACACACCTCTAGAGTAAGCCAGAAG

を、Matteucci, M. D. 及び Caruthers, M. H., Tetrahe-

dron Letters 21, 719(1980)に記載されているホスホアミダイト法により、自動DNA合成機(Applied Biosystemsモデル380B)を用いて合成した。オリゴスクレオチド断片をT4ポリスクレオチドキナーゼにより5' - リン酸化した後、アニーリングせしめ、次にT4DNAリガーゼにより連結して、プレプロ配列をコードする一個の二本鎖DNAを得た。この二本鎖DNAは前記の構造を有する。

実施例2. プレプロ配列をコードする合成DNAと成熟ヒト血清アルブミンAをコードするcDNAとの連結(第1図)

正常ヒト血清アルブミンAのcDNAを含むプラスミドpUC-HSA-CH(参考例2)を制限酵素EcoRI及びCiaIで二重消化して大きい方のフラグメントを得、これを前記の合成DNAとT4DNAリガーゼにより結合させプラスミドpUC-HSA-EHを作成した。pUC-HSA-EHプラスミドをEcoRIで処理し開環し、バクテリアアルカリ性ホスファターゼで5' - リン酸基を除去後、

5' - AATTCTCGAC
GAGCTCTTAA - 5'

の配列から成るXbaI認識部位を含むXbaIリンカーとT4DNAリガーゼにより結合させ環状プラスミドpUC-X-HSAを作成した。

実施例3. ポリA配列及びAATAAAシグナル配列の挿入(第1図)

ヒト血清アルブミンAのcDNAの3'側頭域を含有するλgt11(HSA-1A)(参考例1、第8図)をEcoRIにより消化してヒト血清アルブミンAのcDNAを含有するDNAフラグメントを得、これをEcoRIにより切断したプラスミドpUC18に連結してプラスミドpUC-HSA-1'を得た。このプラスミドpUC-HSA-1'をHindIIIで切断しHSAのポリA配列及びAATAAAシグナルを含む小さい方のフラグメントを得て、これをHindIII処理で開環しアルカリ性ホスファターゼで処理して末端の5'リン酸基を除去したpUC-X-HSAに組み込みpUC-X-HSA-Aプラスミドを作成した。

実施例4. プラスミドpJDB-NeOの作製(第2図)

基本となる大腸菌-酵母菌シャトルベクターとして市販されているプラスミドpJDB207(アマシャ

ム)を使用した。また、NeO(アミノグルコシドホスホトランスファラーゼ3'-(I))遺伝子源として市販されているプラスミドpNEO(ファルマシア)を使用した。プラスミドpNEOをHindIII及びEcoRIにより二重消化し、大きい方のフラグメントを得た。次に、下記の配列：

EcoRI HindIII

5' - AATTGAACCTTATCTCGAGGCCCGG
CTTCGAATAGAGCTCCGGGCCCTCGA - 5'

を有する二本鎖オリゴスクレオチドを、前記pNEOの大きい方のフラグメントにT4DNAリガーゼを用いて連結・環状化してプラスミドpNeO-PLを得た。前記二本鎖オリゴスクレオチドは5' - 末端にEcoRI結合末端配列を有し、3' - 末端にHindIII末端を有するほか、内部にHindIII、XbaI及びSmaI部位を有する。従って前記プラスミドpNeO-PLはNeO遺伝子の上流に複数の制限酵素切断部位を有する。次に、このプラスミドpNeO-PLをHindIII及びBamHIにより二重消化し、1.4Kbフラグメントを得た。プラスミドpJDB207をHindIII及

び $BamH$ I により二重消化し、2 μ m 酵母複製起点及び標識遺伝子 LEU 2 等を含有するベクターフラグメントを得た。次に、これらのフラグメントを T4DNA リガーゼにより連結することによりプラスミド pJDB-NeO を得た。

実施例5. 酵母ADH1プロモーター配列のクローニング(第3図)

酵母菌 AH22 株の染色体 DNA 100 μ g を 1 ユニットの $Sau3A$ I と 37 °C、15 分反応させた (200 μ l の 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、7 mM MgCl₂、50 mM NaCl 中)。10 μ l の 0.5 MEDTA (pH 8.0) を加え、65 °C 10 分反応させ、酵素を失活させた。5% ショ糖-TE (TE: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM MEDTA) と 20% ショ糖-TE を用い、密度勾配を全量 1.2 g/ml で作製した。この勾配の上に上記反応液を重層し、ベックマン社の SW41ローターを用い、22 K rpm で 1.5 時間、16 °C で遠心した。遠心後、各分画について電気泳動を行い、15 kb ~ 20 kb のフラグメントを含む画分に 50 μ l の 3 M 酢酸ナトリウム液 (pH 5.2) を加え、次に 1

ml のエタノールを加え、よく混合した後、-20 °C に一夜静置し、DNA を沈殿させた。遠心 (15 K rpm、5 分、4 °C) により、DNA 沈殿を回収した。この沈殿を 70% エタノールで洗った後、減圧乾燥した。以上の操作により、5 μ g の DNA を得た。

この DNA 1 μ g を 2 μ g の EMBL3 のアーム (Stratagene 社製)、及び 350 ユニットの T4DNA リガーゼ (宝酒造) と混ぜ、16 °C で一夜反応させた (反応液: 10 μ l の 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10 mM MgCl₂、10 mM DTT、1 mM ATP)。上記反応液 1 μ l を用い、GIGA-PACK Plus キット (Stratagene, EGP6-P) により、インピトロ・パッケージング反応を行った。その結果、 3×10^8 pfu の、大腸菌 P2392 株 [hsdR S14(rk⁺, m⁺), supE44, supF58, lacYI, galK2, gal T22, met B1, trp R55, (P2)] に感染しうるファージを得た。1000 pfu のファージを 5.0 μ l の P2392 細胞に加え、37 °C で 20 分反応させた後、2.5 μ l の L-Top-Agarose (LB 培地 (1% トリプトン、0.5% 酵母エキス、1% NaCl) 中 0.7%

アガロース) と共に、直径 90 mm の L-プレート (LB 培地 + 1.5% 寒天) にまいた。このようなプレートを 5 枚用意し、37 °C にて一夜培養し、ブラークを形成させた。ブラークの形成されたプレートを 1 時間 4 °C で保存した。

Hybond-N 膜 (アマシャム) をアガロース面に密着させ、室温に 2 分静置した。膜をアガロースからはがし、接着面を上に、0.5 N NaOH、1 M NaCl を浸した 3 MM フィルター (Whatman) 上に 5 分間置いた。膜を 0.5 M Tris-HCl (pH 7.2)、1.5 M NaCl を浸した 3 MM フィルター上に移し、5 分静置した。2 × SSC 液で膜を洗い、風乾させた。風乾した膜をサランラップで包み、UV 照射し、DNA を膜に固定した。この膜を、ADH1 遺伝子の翻訳領域のアミノ末端より 10 残基に相当する塩基配列を化学合成したプローブ ADH (5' ATG TCT ATC CCA GAA ACT CAA AAA GGT GTT) とハイブリダイゼイションさせた。膜を洗浄後サランラップに包み、XAR-5 フィルム (コダック社) に密着させ、Intensify screen を用い、-70 °C にて 5

時間露光させた。

現像後、ハイブリダイゼイションシグナルを与えたブラークをバスツールビベットの先でかきとり、100 μ l の TM 液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10 mM MgCl₂) に懸濁し、室温に 20 分間静置した。懸濁液 0.5 μ l を 1 μ l の TM 液で希釈し、そのうち 5 μ l を前述した方法で大腸菌 P2392 に感染させ、直径 90 mm のプレートにまきブラークを形成させた。形成させたブラークは、再度上記のようにブラークハイブリダイゼイションを行い、单一ブラークからなるポジティブクローンを得た。ポジティブブラークをバスツールビベットの先でかきとり、5.0 μ l の P2392 細胞に加え、37 °C で 20 分間静置した後、液を 2 μ l の LB 培地、10 mM MgSO₄ に加え、37 °C で 6 時間振とう培養した。クロロホルムを 100 μ l 加え、ポルテックスミキサーにかけ完全に溶菌させた。2,500 rpm で 5 分遠心し、上清を得た。この上清中に 10^{10} オーダーのファージが含まれていた。この上清 800 μ l に 100 μ l の 5 M NaCl を加え、次に 540 μ l のイソプロパン

ールを加えよくまぜ-20℃で20分間静置した。遠心し、得た沈渣を500μlの70%エタノールで洗い、200μlのTEに溶解させた。

1μl [60ユニット/μl]のDNaseI (宝酒造)と、2μlの1mMgCl₂を加え、37℃で30分反応させた。100μlのTE飽和フェノールを加え、ボルテックスミキサーで処理した。12Krpm、5分遠心し、得られた水層をフェノール/クロロホルム(1:1)で一回抽出した。得られた水層に20μlの3M酢酸ナトリウム(pH5.2)を加え、さらに500μlのエタノールを加え、遠心してDNAを沈殿させた。得られた沈渣を70%エタノールで洗った後、減圧乾燥させ、そして50μlのTEに溶解した。この操作で1μl相当のファージDNAが得られた。得られた溶液20μlに、2.2μlの10倍濃度EcoRI緩衝液(0.5mMNaCl, 0.5mMTris-HCl(pH 7.5), 7.0mMMgCl₂)を加え、1μl (5ユニット/μl)のEcoRI (ニッポンジーン)と1μlの10mg/μlのRNaseA(Sigma)を加え、37℃で1時間反応させた。反応後、0.7%アガ

ロース電気泳動を行い、常法に従い、DNAバンドをHybond-N膜にプロッティングさせた。DNAの結合したHybond-N膜は、ブラークハイブリダイゼーションと同一の条件でハイブリダイゼーションを行った。このようにして得られたいつかのクローンのうち、入-AD1では、8.4kbのEcoRIフラグメントにプローブが結合することが分かった。残りのDNA溶液のうち20μlを、前述の条件下で、EcoRIにより切断し、0.7%アガロースゲル電気泳動でフラグメントを分離した。8.4kbEcoRIフラグメントを含むアガロース断片を切り出し、グラスパウダー法(Gene Clean™, Bio-101社)により、DNAをアガロースから分離、精製した。

10μlのTE中に溶出されたDNAを、EcoRIで切断したpUC19と連結反応させ(30ng pUC19, 5.0mMTris-HCl(pH 7.5), 1.0mMMgCl₂, 1.0mMDTT, 1mMATP, 350ユニットT4DNAリガーゼ/30μl中, 16℃, 2時間)、反応液5μlを用いて大腸菌JM107を形質転換させた。形質転換した大腸菌を5.0μg/μl X-Gal, 5mM IPTG, 5.0μg/μlアンビ

シリシを含むL-プレート(X-Gプレート)にまき、コロニーを形成させた。発色していないクローンを5.0μg/μlアンビシリシを含む5μlのLB培地に接種し、37℃で一夜培養し、菌を増殖させた。ミニプレバレーション法によりDNAを調製し、最終的に得られたエタノール沈殿を50μlのTEに溶解させた。調製したDNAの内5μlをEcoRIで切断し(5.0mMTris-HCl(pH 7.5), 7.0mMMgCl₂, 5.0mMNaCl, 1mg/μlRNaseA, 5ユニットEcoRI/15μl)、0.7%アガロースゲル電気泳動を行い、8.4kbのEcoRIフラグメントがpUCに挿入されていることを確かめた。さらに、サザーン法により、このフラグメントがプローブと結合することを確かめた。このようにして得られたクローンpEco8.4のDNAを精製し、0.5μgをSau3A1で完全分解し(5.0mMTris-HCl(pH 7.5), 5.0mMNaCl, 7.0mMMgCl₂, 4ユニットSau3A1/15μl中, 37℃, 2時間)、0.7%アガロースゲル電気泳動によりDNAフラグメントを分離した。1.6kbフラグメントを含むアガロース断片より、

GeneClean™により、DNAを10μl TEに回収した。

これをBamHIで切断したpUC119と連結反応させ、反応液の5μlを用い、大腸菌MV1184を形質転換した。形質転換した大腸菌をX-Gプレートにまき、コロニーを形成させた。発色しないコロニーのDNAをミニプレバレーションで調製し、分析を行った。5μl DNAをEcoRIとHindIIIで切断したもの(5ユニットEcoRI, 5ユニットHindIII)、及び6ユニットSphIで切断したものをそれぞれゲル電気泳動で分析し、前者においては1.6kbのフラグメント、後者においては、1.0kbフラグメントを生ずるクローンを選別した。このようにして得られたクローン、pSau1.6のDNAを調製し、以下の実験に用いた。

DNA 5μgをSmaIとSacIで切断した(1.0mM Tris-HCl(pH 7.5), 2.0mMKCl, 7.0mMMgCl₂, 2.0ユニットSmaI, 2.0ユニットSacI/50μl, 37℃, 2時間)。反応終了後、フェノールークロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDN

Aを回収した。DNA沈澱を50μlのExoIII緩衝液(50mMTris-HCl(pH8.0),100mMNaCl,5mM $MgCl_2$,10mM2-メルカプトエタノール)に溶した。もう一本のチューブに50μlのMB緩衝液(40mM酢酸ナトリウム(pH4.5),100mMNaCl,2mM $ZnCl_2$,10%グリセロール)を入れ氷中に置いた。DNA液に180ユニットのExoIIIスクレアーゼ(宝酒造)を加え、37℃に保温した。酵素添加後30秒ごとに5μlをサンプリングし、MB緩衝液の入ったチューブに移した。サンプリング終了後、氷上のチューブを65℃、5分保温し、次に37℃に冷し、50ユニットのマング・ビーンスクレアーゼを加え、37℃、30分保温した。反応後、この液をTEで饱和させたフェノールで抽出し、エタノール沈澱でDNAを回収した。回収したDNAを30μlのTEに溶した。1μlをとり2μlの10Xライケーション液(500mMTris-HCl(pH7.5),100mM $MgCl_2$,100mMDTT,10mMATP)を加え、16μlのTE、1μlのT4DNAリガーゼ(350ユニット/μl)を加え、16℃で一夜保温し

た。次に、70℃にて10分間保温し、リガーゼを失活させた後、0.2M KClを2μl、SmaIを1μl(10ユニット/μl)加え、37℃、1時間保温した。次に70℃にて5分間保温し、氷中に移した。

これを用い、MV1184を形質転換させ、形質転換体を一夜37℃で培養し、コロニーを形成させた。コロニーからDNAを調製し、欠失変異が生じているクローンを検出した。次に、欠失の起こっているクローンの一本鎖ファージDNAを調製した。ファージDNAは、7-DEAZA-ジデオキシ・シクエンシングキット(宝酒造)を用い、メカーマニュアルに従い、配列決定を行い、ATGより上流-10bpまで欠失したクローンpDEG-10を得た。pDEG-10のDNAを調製し、1μg DNAをEcoRIで完全消化し、100μlのTEに溶解させた。この溶液2μlに100ngのXbaIリシンカーアATTGCTCGAGC)を加え、10μlの反応液中で連結反応させた(16℃、2時間)。70℃にて10分間保温し酵素を失活させ、1μlの0.5M NaCl、

5ユニットのEcoRIを加え、37℃30分間保温した後、これを用いて、大腸菌MV1184を形質転換させた。得られたコロニーからDNAを調製し、EcoRIで切断されず、XbaIで切断されるクローンを選別した。このようにしてpDEG-10(XbaI)アモーターカセットベクターを得た。

このベクターpDEG-10(XbaI)を含有する大腸菌Escherichia coli MV1184/pDEG-10(XbaI)は工業技術院微生物工学技術研究所に微研菌庫寄第10311号(FERM P-10311)として寄託されている。

実施例6. 酵母ADH1ターミネーター配列のクリーニング(第4回)

pEC08.4 1μgを4ユニットのBamHIで切断した(10mM Tris-HCl(pH7.5),7mM $MgCl_2$ /20μl,37℃,1時間)。次に、1M NaClを3μl加え、4ユニットのSphIを加え、1時間37℃に保温した。反応後0.7%アガロースゲル電気泳動を行い、1kbのフラグメントを分離し、Gene CleanでDNAを抽出した。回収したDNAを、SphIとSmaIで切断したpUC118と連結反応させ、

MV1184を形質転換させた。形質転換クローンからDNAを調製し、フラグメントの挿入されたクローンを検した。このDNAを調製し、1μg DNAをSphI及びHindIIIで切断し(1×EcoRI緩衝液、4ユニットSphI,1.2ユニットHindIII)、1.2%アガロースゲル電気泳動を行い、0.33kbフラグメントを単離し、そしてGene CleanによりDNAを抽出した。これを、プラスミドpMMTV-PLIをHindIII及びSphIにより二重消化して得られた5.7kbフラグメント50ngと連結反応(全反応溶液体積20μl)させた。

反応後、大腸菌JM107を形質転換させ、アンビシリンを含むL-アラブレート(L-ampブレート)上でコロニーを形成させた。コロニーよりDNAを調製し、制限酵素分析により挿入DNAを調べ、目的とするフラグメントが挿入されたクローンを得た。そのクローンからDNAを調製し、その0.5μgをHindIIIで切断した。70℃5分保温して、氷上に移し、1μlの1mM dNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTPを各々1mM含む)、と2ユニットのDNAポ

リメラーゼ(Klenow フラグメント) (宝酒造) を加え、37℃で30分間保温した。フェノール・クロロホルムで除蛋白後、DNAをエタノールで沈殿させた。DNAを10μlの1×ライゲーション液に溶かし、350単位のT4DNAリガーゼを加え、16℃で一夜保温した。70℃で10分間処理し、リガーゼを失活させた後、0.5MNaClを1.2μl、HindIIIを12ユニット加え、37℃で30分間処理した。これを用い、大腸菌JM107を形質転換させた。L-ampプレートに形成されたコロニーの一部をL-amp液体培地(L-ampプレートから寒天を除いたもの)中で培養し、得られた菌体からDNAを調製し、HindIIIサイトが失われたものを得た。DNAを調製し、0.5μgDNAを4ユニットのBamHI、12単位のSphIで切断した(10mMTris-HCl(pH7.5)、150mMNaCl、7mMMeCl₂)。1.4%アガロースゲル電気泳動で、0.34kbのDNAフラグメントを分離し、Gene CleanでDNAを10μlのTEに回収した。これを30ngのpAT153を、BamHI及びSphIで切断して得た3.5kbフラグメントと連結反応させた。

反応液で大腸菌JM107を形質転換させ、L-ampプレートにコロニーを形成させた。コロニーの一部をL-amp液体培地中で培養し、得られた菌体からDNAを調製し、0.42kbのサイズのBamHI-SalI二重消化物(DNAフラグメント)を与えるクローニングをさがした。得られたDNA0.5μgを、BamHI及びSalIで切断し、1.4%アガロースゲル電気泳動により、0.42kbフラグメントを分離し、Gene Cleanにより5μlのTEに回収した。これを、BamHI-SalIで切断した10ngのpUC-119と連結反応させた。反応液1μlを用い、大腸菌MV1184を形質転換させ、X-Gプレートにまき、コロニーを形成させた。白色のコロニーより、DNAを調製し、フラグメントの挿入されたものを得た(pUC-ATE:ターミネーターカセットベクター)。

このベクターpUC-ATEを含有する大腸菌Escherichia coli MV1184(pUC-ATE)は工業技術院微生物工業技術研究所に微生物工芸技術研究所に微工研菌寄第10310号(FERM P-10310)として寄託されている。

実施例7. 酵母用発現ベクターの作製

(サンドイッチベクター)(第5図)

プロモーター・カセットベクターpDEG-10(XbaI) 0.5μgをHindIII及びXbaIで切断し、0.7%アガロースゲル電気泳動により1.6kbのフラグメントを分離した。一方、pJDB-Neo 0.5μgをHindIII及びXbaIで切断し、8kbフラグメントを分離した。両者を連結し大腸菌JM107に導入し、アンビシリントリニン耐性コロニーを得た。コロニーよりDNAを得、挿入フラグメントを確認した(pAHG-10-Neo)。

pJDB-Neo 0.5μgをBamHI及びSalIで切断し、約8kbのフラグメントを分離した。一方1μgのpUC-ATEをBamHI及びSalIで切断し、0.42kbのフラグメントを分離した。両者を連結し、形成されたプラスミドにより大腸菌JM107を形質転換させ、アンビシリントリニン耐性コロニーを得た。これらのコロニーよりDNAを調製し、目的のプラスミドpJDB-Neo-ATEを有していることを確かめた。pJDB-Neo-ATE 0.5μgをHindIII及びXbaIで切断し、約8kbのフラグメントを得た。一方、pDE-6-10(XbaI)

より、1.6kbのHindIII-XbaIフラグメントを回収した。両者を連結し、形成されたプラスミドにより大腸菌JM107を形質転換させた。アンビシリントリニン耐性コロニーのDNAを調べ、目的のプラスミド(pAHG-10-Neo-ATE)を有しているクローニングを発見した。

このベクターを含有する大腸菌Escherichia coli JM107/pAHG-10-Neo-ATEは工業技術院微生物工芸技術研究所に微生物工芸技術研究所に微工研菌寄第10309号(FERM P-10309)として寄託されている。

実施例8. 発現プラスミドの作製(第6図)

前記の様にして調製した、NeO遺伝子の上流にADHプロモーターを行し、そしてNeO遺伝子の下流にADHターミネーターを有するプラスミドpAHG-10-Neo-ATEをXbaI及びBamHIにより二重消化することによりNeO遺伝子が除去されたベクターフラグメントを得た。他方、ヒト血清アルブミンAのcDNAを含有するプラスミドpUC-X-HSA-A(実施例3)をXbaI及びBamHIで二重消化し、人工リーダー配列を含むプレプロヒト血清

アルブミンAのcDNA及びポリAを含有するフラグメントを得た。これらをT4 DNAリガーゼにより連結することにより、発現プラスミドpJDB-ADH-HSA-Aを得た。

このプラスミドを含有する酵母 Saccharomyces cerevisiae AH22/pJDB-ADH-HSA-Aは工業技術院微生物工業技術研究所に微生物工芸研究室寄第10307号(FERM P-10307)として寄託されている。

実施例9. 発現プラスミドによる酵母宿主の形質転換

発現プラスミドによる酵母菌の形質転換は基本的に橋本英明、木村光【発酵と工業43, 630-637(1985)】のKUR法に従い、少し改良した方法によって行った。まずYPD培地(2%ボリベブトン(Difco)、1%酵母エキス(Difco)、2%グルコース)5mLにAH22株(MATA, leu2-3, leu2-112, his4-519, Can1)のYPD培地による一晩培養液0.1mLを加え30℃で約4時間(濃度がOD 600で0.5に達するまで)振盪培養を行った。4℃で2,000rpm、5分間の遠心を行い集菌し、菌体を

5.0mLの0.1M LiSCNに懸濁し、そのうち1.5mLを分取し、2,000rpm、5分間または10,000rpm、1分間の遠心で集菌した。得られた菌体を2M LiSCN 1.0mL、5.0%PEG4000 4.6mLに再懸濁し、そこに1.0mLのDNA溶液(5~10μgのDNAを含む)を加え、30℃で一晩保温する。その懸濁液に1mLの滅菌蒸留水を加えゆるくボルテックスミキサーにて振盪する。次に2,000rpm、5分間または10,000rpm、1分間の遠心を行い、得られた菌体を100mLの滅菌蒸留水に再懸濁し、選択用の寒天培地(SD培地: 2.0μg/ mLアデニン硫酸塩、2.0μg/ mLアルギニン硫酸塩、2.0μg/ mLメチオニン、2.0μg/ mLヒスチジン硫酸塩、2.0μg/ mLトリプトファン、2.0μg/ mLウラシル、3.0μg/ mLイソロイシン、3.0μg/ mL塩酸リジン、3.0μg/ mLチロシン、5.0μg/ mLフェニルアラニン、150μg/ mLバリン、0.15%アミノ酸不含イースト・ニトロゲン・ベース(Difco)、0.5%塩酸アンモニウム、2%デキストロースに1.5%の寒天を加えたもの)にまいた。生じたコロニー(Leu⁺)を

SD培地5mLに懸濁し、2日間30℃で振盪培養した。2,000rpm 5分間、4℃での遠心により集菌し、菌体を0.5mLの1Mソルビトールに再懸濁し、遠心後、菌体を0.5mLの1Mソルビトール、0.1%2-メルカプトエタノール、400μg/mLのザイモリエース(Zymolyase-100T生化学工業)に再懸濁した。30℃で30分間保温後生成したスフェロアラストを遠心(2,000rpm、5分間)して集め、100μLの溶液I(5.0mMグルコース、1.0mM EDTA、2.5mM Tris-HCl(pH8.0))に再懸濁し、次に200μLの溶液II(0.2N NaOH、1%SDS)を加え、よく混合した後、氷上に5分間放置した。150μLの5M酢酸カリウムを加え、よく混合し氷上に10分間放置した後、15,000rpm、5分間、4℃での遠心を行い、得た上清を新しいチューブに移した。等量のフェノール/クロロホルム(1:1混合液)を加え激しく攪拌し、遠心(12,000rpm、5分間)して得た水層を新しいチューブに移し、750μLのエタノールとボルテックスミキサーを用いてよく混合した。混合液を15,000rpm、5分間

遠心し、得られた沈殿に0.5mLの70%エタノールを加えボルテックスミキサーを用いて振盪した後、15,000rpm、5分間の遠心で沈殿を回収した。このDNAの沈殿を真空中で減圧乾燥し、次に3.0mLのTE緩衝液に溶解した。プラスミドpJDB-ADH-HSA-Aを含むAH22の形質転換株から得られたDNA標品を各種酵素(たとえばHindIII, XbaI, EcoRI, BamHI, SalIなど)単独または、組合せにより制限酵素分解し、得られたフラグメントをアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分析することによりプラスミドの構造を確認した。

実施例10. 形質転換体によるヒト血清アルブミンAの生産(第7図)

SD(-Leu)培地上に生じた単一のコロニーを5.0mLの新鮮なSD(-Leu)培地に懸濁し、30℃で2日間振盪培養し、OD₆₀₀が約2.0になった時点で培養液の0.1mLを5.0mLのYPD培地に加えた。これを24時間30℃で、OD₆₀₀が約3.0になるまで培養した。培養液を5,000rpm、10分間、4℃

で遠心し、上清液分を回収した。上清液分に等量の9.9%エタノールを加え、混合した後30分間4℃に放置した。次に12,000rpm、10分間、4℃で遠心し、沈澱物を得た。この沈澱物を100μlの1×ローディング(Loading)緩衝液(5%2-メルカプトエタノール、0.0025%プロモフェノールブルー、2%SDS、0.025M Tris-HCl、8%グリセロール)に溶解し、そのうち10μlを電気泳動ゲル(SDS-ポリアクリルアミドゲル:4~20%濃度勾配ゲルB4(幅)×90(高さ)×1.0(厚み)(単位はmm))に重層して分析した。泳動は泳動緩衝液(0.025M Tris-HCl(pH8.4)、0.192Mグリシン、0.1%SDS)を用い、60mAの定電流下60分間行った。同時に泳動したマーカーは卵白リゾチーム(分子量14,400)、トリプシンインヒビター(分子量21,500)、炭酸脱水酵素(分子量31,000)、オバルブミン(分子量45,000)、子牛血清アルブミン(分子量66,200)、ホスホリラーゼB(分子量92,500)(全てBIO-RAD社製)であった。泳動終了後、常法に従いクマシ

ー・ブリリアント・ブルーにより染色し、または以下に示すようにウエスタンブロッティング後免疫検出を行った。泳動後、分離された蛋白質をSartorius社製のセミドライブロッターを用いてニトロセルロースフィルター(BIO-RAD社)に移した。フィルターを、1時間メタノールに浸した後、5分間25mM Tris-HCl(pH10.4)/20%メタノールに浸し泳動ゲルと密着させた。これを上記緩衝液、及び20%メタノールを含む0.3M Tris-HCl(pH10.0)と25mM Tris-HCl(pH9.4)/40mM 6-アミノ-n-カブロン酸等の緩衝液に各々浸したろ紙ではさみブロッターに装着した。6Vの定電圧を約1.5時間かけた後、フィルターを3%ゼラチンを含む20mM Tris-HCl(pH7.5)/500mM NaCl(TBS)溶液中で37℃、1時間振盪した後TBS/0.05%Tween-20中で5分間振盪することによりペーパーを洗浄した。次に抗ヒト血清アルブミンウサギ抗体(カッペル社)を1%ゼラチンを含むTBSで2,000倍に希釈した溶液40μl中でペーパーを室温で1晩振盪した。ペー

バーを0.05%のTween-20を含むTBS(pH7.5(T-TBS))で5分間振盪しながら洗浄した。この操作をもう一度繰り返した後第二抗体(西洋ウサギペルオキシダーゼで標識したヤギ抗ウサギIgG抗体、BIO-RAD社製)を1%ゼラチンを含むTBSで3,000倍に希釈した溶液40μl中でペーパーを室温で1時間振盪した。次にT-TBSで5分間ずつ2回およびTBSで5分間1回上述のように洗浄した。当該バンド(HSA)の検出は4-クロロナフトール30μlを10μlのメタノールに溶かした溶液とTBS50μl、30%過酸化水素30μlを混ぜた溶液に浸漬することにより行い、発色反応は蒸留水で希釈することにより停止させた。結果を第7図に示す。図中、(A)はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の後クマシ・ブリリアント・ブルーで染色したものであり、左側が分子量マーカーで右側が酵母で産生・分泌されたヒト血清アルブミンを含む試料の結果であり、(B)はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の後、ウエスタンブロッティングを行い抗ヒト血清アル

ブミン抗体と結合させ、ヒト血清アルブミン及びこのフラグメントを特異的に染色したものであって、左側が対照として用いた精製ヒト血清アルブミンで右側が酵母で産生・分泌されたヒト血清アルブミンを含む試料についての結果である。

実施例11. 酵母菌産生正常ヒト血清アルブミンAとヒト血清から精製した正常ヒト血清アルブミンAとの生化学的同等性

(1) 分子量

酵母菌培養液より単離した正常ヒト血清アルブミンA試料を2-メルカプトエタノールで還元し、そしてSDS処理を施した後に、SDS中1.2%から3.0%のポリアクリルアミド濃度勾配ゲルに添加し、Laemmli, U.K. (1970) Nature, 227, 680-685に記載の条件で電気泳動を行った。分子量標準としてホスホB(分子量94,000)、牛血清アルブミン(分子量67,000)、オバルブミン(分子量43,000)、炭酸脱水酵素(分子量30,000)、大豆トリプシンインヒビター(分子量20,000)及びラクトアルブミン(分子量14,400)を使用し、ク

マシー・ブリリアント・ブルー染色により蛋白質の検出を行った。ヒト血清より精製された市販の血清アルブミンを対象として同時に泳動し、酵母により分泌されたアルブミンとその移動度を比較した。その結果、酵母菌產生正常ヒト血清アルブミンAとヒト血清から精製されたヒト血清アルブミンは、ともに同じ移動度を示し、分子量67,000であった。この結果を第12図に示す。

(2) 電気的挙動

(Native) ゲル電気泳動

酵母菌培養液より単離した正常ヒト血清アルブミンA試料をそのまま、上記と同じ12%から30%のポリアクリルアミド濃度勾配ゲルであるがSDSを除いたゲルに添加し、SDSを除いた上記の条件で電気泳動を行った。蛋白質のバンドを、クマシー・ブリリアント・ブルー染色によって検出した。ヒト血清より精製された市販のヒト血清アルブミンを対象として同時に泳動し、酵母菌產生正常ヒト血清アルブミンAとの電気泳動ゲルでの挙動を比較した。SDSを除いたNativeゲ

ル電気泳動においても、酵母菌產生正常ヒト血清アルブミンAは、ヒト血清より精製されたヒト血清アルブミンモノマーと同じ移動を示した。この結果を第13図に示す。

(等電点電気泳動)

等電点電気泳動は、LKB社製Ampholine PAG plate pH範囲3.5-9.5を用い、同社のマニュアルに添って行った。等電点標準として、同社PIマーカー：C-フィコシアニン(pI4.75, 4.85)、アズリン(pI5.65)、トリフルオロアセチルミオグロビン(ブタpI5.9)、ミオグロビン(ブタ、pI6.45)、ミオグロビン(ウマ、pI7.3)、ミオグロビン(クジラ、pI8.3)及びチトクロムC(pI10.6)を使用した。酵母菌產生正常ヒト血清アルブミンAは、ヒト血清から精製されたヒト血清アルブミンと同様にpI4.9の主要バンドとpI4.7, 4.65の二本のマイナーバンドに分離した。

この結果を第14図に示す。

(3) 免疫化学的性質

免疫拡散を、Ouchterlony, *Ö. Progr. Allergy*,

6(1962)30、に記載の条件で行った。沈降線形成後生理食塩水で脱蛋白質を行った後、クマシー・ブリリアント・ブルーにより沈降線の染色を行った。用いた抗血清は、Cappel社より入手したウサギ抗ヒト血清アルブミン抗血清及びベル・フリーズ社よりのヤギ抗ヒト血清アルブミン抗血清の二種類である。どちらの抗血清を用いた場合でも、酵母菌產生正常ヒト血清アルブミンAはヒト血清より精製されたヒト血清アルブミンとは完全に融合した沈降線を形成し、この方法では抗原性における両者の違いはみられなかった。結果を第15図に示す。

(4) アミノ末端側アミノ酸配列決定

酵母菌產生正常ヒト血清アルブミンA 100μgを用い、アブライド・バイオシステム社製気相法プロテインシーケンサー477Aにより、同社のマニュアルに従ってアミノ酸配列の決定を行った。その結果以下に示すとおり、アミノ末端アミノ酸Aspより、32番目のGlnまでアミノ酸残基が同定され、すでに報告のあるヒト血清アルブミンの

アミノ末端から32番目までのアミノ酸配列と完全に一致していた。アミノ末端側アミノ酸の回収率より、用いた標品は、少なくとも93%はアミノ末端アミノ酸がそろっていると考えられる。この結果からは、不完全なプロセッシングによるプロ配列等の残存は認められなかった。

酵母菌產生正常ヒト血清アルブミンAのアミノ末端側アミノ酸配列はAsp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly-Glu-Glu-Asn-Phe-Lys-Ala-Leu-Val-Leu-Ile-Ala-Phe-Ala-Gln-Tyr-Leu-Gln

(5) HPLC上の挙動

(逆相カラムクロマトグラフィー)

高速液体クロマトグラフィー装置は、アブライド・バイオシステムズ社製130Aセパレーションシステムを使用し、Aquapore RP-300カラム(2.1mm I.D. × 30mm)によって分離を行った。カラムは、0.1%トリフルオロ酢酸で平衡化を行い、蛋白質の溶出は、0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度勾配溶出法によって行った。濃度

勾配は、アセトニトリル濃度0%から100%までの直線濃度勾配を45分間の間で形成することによって行った。この時の流速は200 μ l/minである。

この条件で、酵母菌產生正常ヒト血清アルブミンAは单一の鋭いピークとして得られ、ヒト血清から精製されたヒト血清アルブミンのピークとカラム上での保持時間及びピークの形において区別できなかった。さらに、これら二つのヒト血清アルブミンを混合し、同カラムで溶出した場合でも、单一の鋭いピークとして得られ、二つのアルブミンの逆相カラム上での挙動は、まったく同一であった。

この結果を第16図に示す。図中、Aはヒト血清より精製されたヒト血清アルブミン、Bは酵母菌產生正常ヒト血清アルブミンA、そしてCはヒト血清由來ヒト血清アルブミンと酵母產生正常ヒト血清アルブミンAとの混合物の逆相カラムクロマトグラフィーの結果である。

(ハイドロキシアバタイトクロマトグラフィー)

高速液体クロマトグラフィー装置として島津製作所社製SCL-6A, LC-6Aシリーズシステムを使用し、東亜燃料工業製高分離分析用ハイドロキシアバタイトカラムTAPS-020810 (7.5 mm I.D×10cm) によって分離を行った。溶出は、10mMリン酸緩衝液/0.05%アジ化ナトリウムから0.3Mリン酸緩衝液/0.05%アジ化ナトリウムへの直線濃度勾配を30分間で形成させるように行った。この時の流速は1 ml/min である。試料としては、酵母培養分泌液をDEAE-Sepharose CL-6Bで濃縮したものを、40%飽和の硫酸沈殿で得られた上清を、さらに60%飽和の硫酸で沈殿させたものを用いた。酵母產生正常ヒト血清アルブミンAのピークの溶出時間は11.5分であり、その溶出時間は、ヒト血清より精製されたヒト血清アルブミンの溶出時間と一致していた。したがって、ハイドロキシアバタイトカラム上での挙動においても、酵母產生正常ヒト血清アルブミンAは、ヒト血清由來のものと区別できなかった。

この結果を第17図に示す。図中Aは酵母培養液濃縮分画、Bはヒト血清からの精製ヒト血清アルブミンのハイドロキシアバタイトクロマトグラフィーの結果を示す。

参考例1. 正常ヒト血清アルブミンA cDNAを含む クローンのスクリーニング(第8図)

正常ヒト血清アルブミンA cDNAを含むクローンのブラークハイブリダイゼーションによるスクリーニングのため米国CLONTECH社の λ gt11をベクターとして作成されたヒト肝cDNAライブラリーや用いた。 λ gt11組換え体ファージを大腸菌Y1090を宿主として感染させ、形質転換ブラーク計5.5 \times 10³個をLB寒天培地上に形成させ組換えDNAをメンブランフィルター(Amersham社Hybond-N)に移した後、³²P放射性同位元素で標識した合成オリゴグスクレオチド3種(比活性 \geq 10⁶cpm/ μ g)をプローブとして用いスクリーニングした[Benton及びDavis Science 196, 180-182(1977)]。この3種のプローブは各々Lawnら(Nucleic Acids Res 9, 6103-6114(1981))に

よって報告されたヒト血清アルブミンcDNAの配列のうち5'非翻訳領域(翻訳開始のATGコドンより12スクレオチド上流からATGコドンの前のスクレオチドまでの部分)と翻訳領域(アミノ末端のメチオニンコドンすなわちATGより9番目のアミノ酸ロイシンをコードする部分)を含むもの(HSA-1)、248番目のグリシンから260番目のロイシンをコードするもの(HSA-2)、並びに576番目のバリンからカルボキシル末端585番目のロイシンをコードする部分とそれに続く6スクレオチドから成る3'-非翻訳領域を含むもの(HSA-3)と同じ配列である。これらのプローブの塩基配列を第9図に示す。このプローブの合成は自動DNAシンセサイザにより行い、標識は[γ -³²P]ATPとポリスクレオチドキナーゼを用いて行った。HSA-2で陽性のシグナルを与えた200個の λ gt11クローンのうち4個のクローンからDNAを調製(BlattnerらScience 202, 1279-1284(1978))し、これをEcoRIで消化し、消化物のサザーンプロットをHSA-2プローブと

ハイブリダイズさせた (Southern, J. Mol. Biol. 503-517(1975))。ハイブリダイズしたフラグメントは3つのクローンから得られ各々1.8 Kb, 1.4 Kb, 1.3 Kbの長さであった。このうち1.8 Kbと1.3 Kbの長さのフラグメントをpUC 19ベクターにサブクローニングした。このサブクローンを HSA-1と HSA-3を各々プローブとしてコロニーハイブリダイゼーション (Grunstein および Hogness Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965 (1975)) によりスクリーンした。この結果 HSA-3のみにハイブリダイズするクローン λ gt11(HSA-1-A) が得られた。このクローンの各種DNA断片を塩基配列決定用ベクター M13mp18 および mp19 RF-DNA 上に移し、ダイデオキシスクレオチドターミネーション法 (Sanger, F., Nicklen, S. および Coulson, A. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467(1977)) により塩基配列を決定した。一方 HSA-2をプローブとして行った λ gt11クローンのブラークハイブリダイゼーションにおいて陽性のシグナルを与えたクローンのうち20個に

ついて HSA-1をプローブとして再びブラークハイブリダイゼーションを行い、1個の陽性のシグナルを与えるクローン λ gt11(HSA-2) を得た。これからファージDNAを調製しEcoRI消化物について HSA-1をプローブとして用いサザーンハイブリダイゼーションを行い1.25Kbのフラグメント(HSA-2) がプローブとハイブリダイズすることを確認した。このフラグメントの塩基配列をダイデオキシスクレオチドターミネーション法で決定した。HSA-2は HSA-3プローブとは交雑しなかった。この結果 HSA-2はカルボキシル末端側をコードする部分を欠き HSA-1-Aはヒト血清アルブミンのアミノ末端側をコードする部分を欠き、さらに 304番目のセリンをコードするコドン (TCA) が翻訳終止コドンのオバールコドン TGAに変化していることがわかった。この2つのDNAフラグメントの制限酵素地図を第8図に示す。酵素認識サイトの正確な位置は最終的な塩基配列から得た。

第8図からわかるように HSA-1-Aと HSA-2の

2つのDNAを適当な位置 (例えば Xba I や Pst I サイト) で切断し互いに再結合すればシグナルペプチドやプロ配列の結合したヒト血清アルブミンの前駆体タンパク質の全長をコードできるcDNAを構築することができる。

参考例2. プラスミドpUC-HSA-CHの作製 (第10図)

大腸菌アルカリ性ホスファターゼ (phoA) のシグナルペプチドと正常ヒト血清アルブミンAが融合したタンパク質をコードするDNAを含むプラスミドpUC-phoA-HSA-Aを次の様にして造成した。

ヒト肝cDNAライブラリから得た HSAcDNAを含むクローン λ gt11(HSA-2) からEcoRIと Xba I消化によって生じるフラグメントを調製し、これをpUC 19プラスミドのEcoRIと Xba Iとの二重消化物のうち大きな方のフラグメントと T4DNAリガーゼを用いて結合させ組換えプラスミドpUC-HSA-EXを構築した。

このプラスミドから Aha IIIと Sal Iの二重消化により生ずる小さい方のフラグメントを精製した。このフラグメントは成熟正常ヒト血清アルブミン

Aタンパク質の12番目のLysから 356番目のThrまでをコードする。成熟正常ヒト血清アルブミンAタンパク質をアミノ末端からコードする遺伝子を構築するために5'端に相当するDNA配列を、化学合成したフラグメント2本をアニールすることにより作成した。この合成DNA配列はアルカリ性ホスファターゼのシグナルペプチドをコードするDNA配列と融合できるように Hpa II 及び Cla I酵素切断によって生ずる粘着末端配列 CGを5'端側に有し成熟正常ヒト血清アルブミンAタンパク質の1番目のアミノ酸Aspから 11番目のアミノ酸Pheをコードする配列を有している。このアニールさせたDNA配列にT4ボリスクレオチドキナーゼを作用させて5'端をリシン酸化させたものと、pUC-HSA-EXから生じた Aha III / Sal I二重消化物とを混合し、さらにこれに大腸菌のマルチコピークローニングベクターの代表的なものの一つpAT 153(Amersham社製、Twigg, A. J. 及び Sherratt, D. Nature 283 216-218, 1980) の Cla I / Sal Iの二重消化物のうち大きなフラ

グメントと混合しこの3者をT4 DNAリガーゼにより結合させ、組換えプラスミドpAT-HSA-CXを得た。このプラスミド上で正常ヒト血清アルブミンAの1位のアミノ酸Aspから11位のアミノ酸PheをコードするDNA配列がつながった。pAT-HSA-CXをEcoRI/XbaIで二重消化し、正常ヒト血清アルブミンAのAsp1~Phe356をコードするDNA配列を含む小さい方のフラグメントを得た。

一方 HSA-Aのカルボキシル末端側をコードするcDNAは、ヒト肝cDNAライブラリから得たクローンλgt11(HSA1-A)から外来cDNA配列の挿入されているEcoRIフラグメントを調製し、pUC18プラスミドのEcoRIサイトに挿入することにより組換えプラスミドpUC-HSA-1中にクローニングした。これよりHSA-Aの358番目のアミノ酸Leuからカルボキシル末端の585番目のLeuをコードし、さらに3'側の非翻訳領域62スクレオチドを含むXbaI/HindIIIの二重消化物を調製した。これをpAT-HSA-CXより得たEcoRI/XbaI二重消化物及びpUC18のEcoRI/HindIII二重消化物のうち大き

なフラグメントと混ぜてT4DNAリガーゼにより連結反応を行い、成熟正常ヒト血清アルブミンAのcDNA全体を含む組換えプラスミドpUC-HSA-CHを得た。

成熟正常ヒト血清アルブミンAの全アミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列及び対応するアミノ酸配列を第11-1図~第11-3図に示す。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、プラスミドpUC-X-HSA-Aの作製の過程を示す。

第2図は、プラスミドpJD8-Neoの作製の過程を示す。

第3-1図及び第3-2図は本発明のADH1プロモーターカセットベクターpDEG-10(Xba)の作製の過程を示す。

第4-1図及び第4-2図は、ADH1ターミネーターカセットベクターpUC-ATEの作製の過程を示す。

第5図は、酵母用発現ベクター(ADH1サンドイッチベクター)pAH6-10-Neo-ATEの作製の過程を示す。

示す。

第6図は、発現プラスミドpJD8-ADH-HSA-Aの作製の過程を示す。

第7図は、ヒト血清アルブミンcDNAを含む形質転換体AH22(pJD8-ADH-HSA-A)の培養により產生された成熟HSAをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、クマシー・ブリリアント・ブルー染色により検出したもの(A)及びウエスタンブロッティングにより検出したもの(B)を示す。

第8図はこの発明の正常ヒト血清アルブミンAの全体をコードするcDNA(HSACDNA)、並びにこのcDNAの造成に使用された、3'末端側をコードするcDNA(HSA-IA)及び5'末端側をコードするcDNA(HSA-II)の制限酵素地図を示す。

第9図は、ヒト血清アルブミンAのcDNAのスクリーニングに使用した3種のプローブの塩基配列を示す。

第10図は、プラスミドpUC-HSA-CHの作製の過程を示す。

第11-1図~第11-3図は、ヒト血清アル

ブミンAの全体をコードするcDNAの塩基配列を示す。

第12図は、酵母產生正常ヒト血清アルブミンAとヒト血清由来ヒト血清アルブミンの分子量を、SDS中ポリアクリルアミド濃度勾配ゲル電気泳動によって比較した結果を示す。

第13図は、酵母產生正常ヒト血清アルブミンAとヒト血清由来ヒト血清アルブミンのNativeポリアクリルアミド濃度勾配ゲル電気泳動における挙動を比較した結果を示す。

第14図は、酵母產生正常ヒト血清アルブミンAとヒト血清由来ヒト血清アルブミンとを等電点電気泳動において比較した結果を示す。

第15図は、酵母產生正常ヒト血清アルブミンAとヒト血清由来ヒト血清アルブミンとをOuchterlony法により比較した結果を示す。

第16図は、酵母產生正常ヒト血清アルブミンAとヒト血清由来ヒト血清アルブミンの逆相クロマトグラフィーにおける挙動を比較したものである。

第17図は、酵母產生正常ヒト血清アルブミンAとヒト血清由来ヒト血清アルブミンのハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーにおける挙動を比較した結果を示す。

特許出願人

東亞燃料工業株式会社

特許出願代理人

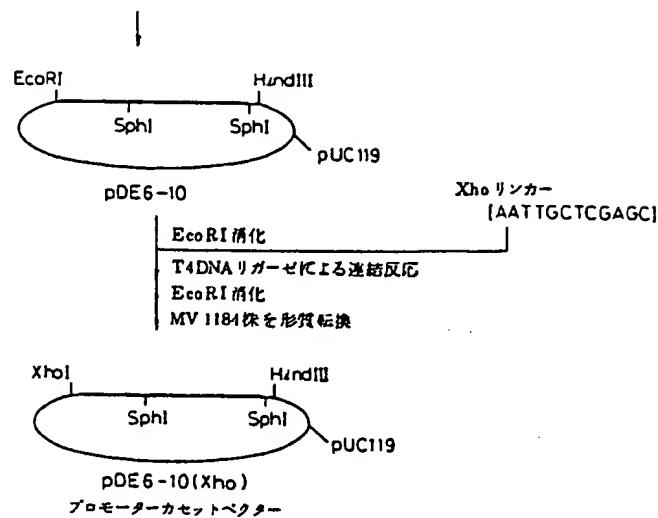
弁理士　脣　木　朗

弁理士 石 田 敬

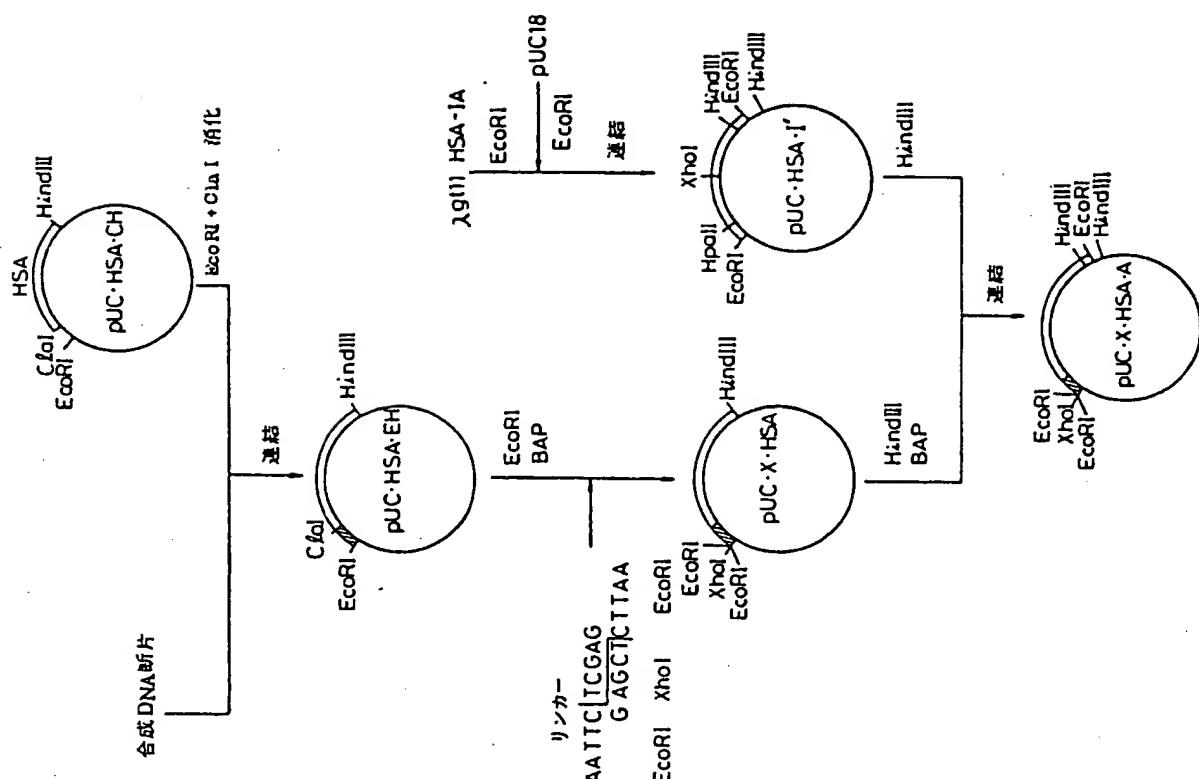
弁理士 福 本 横

弁理士 山 口 昭 之

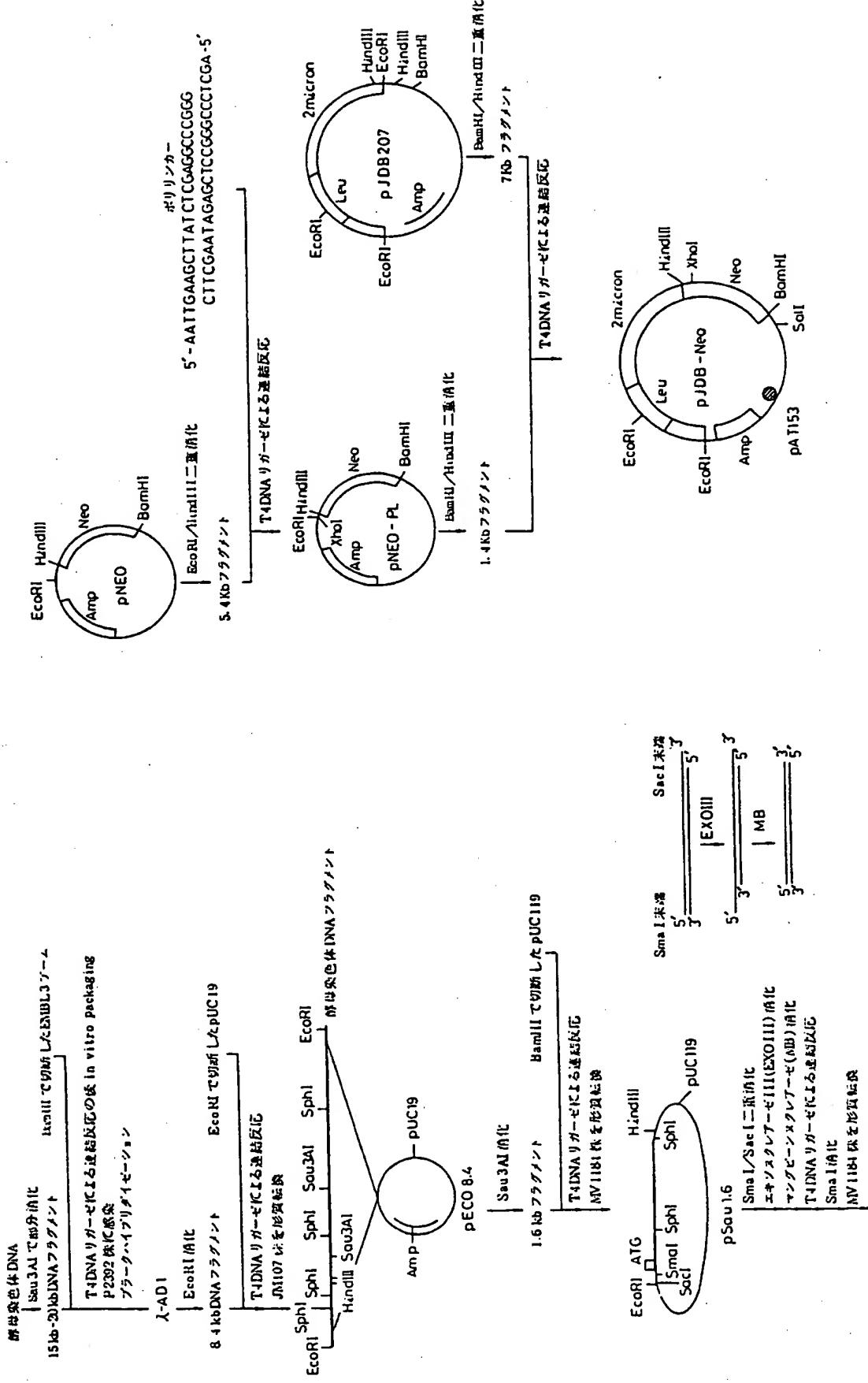
弁理士 西 山 雅 也

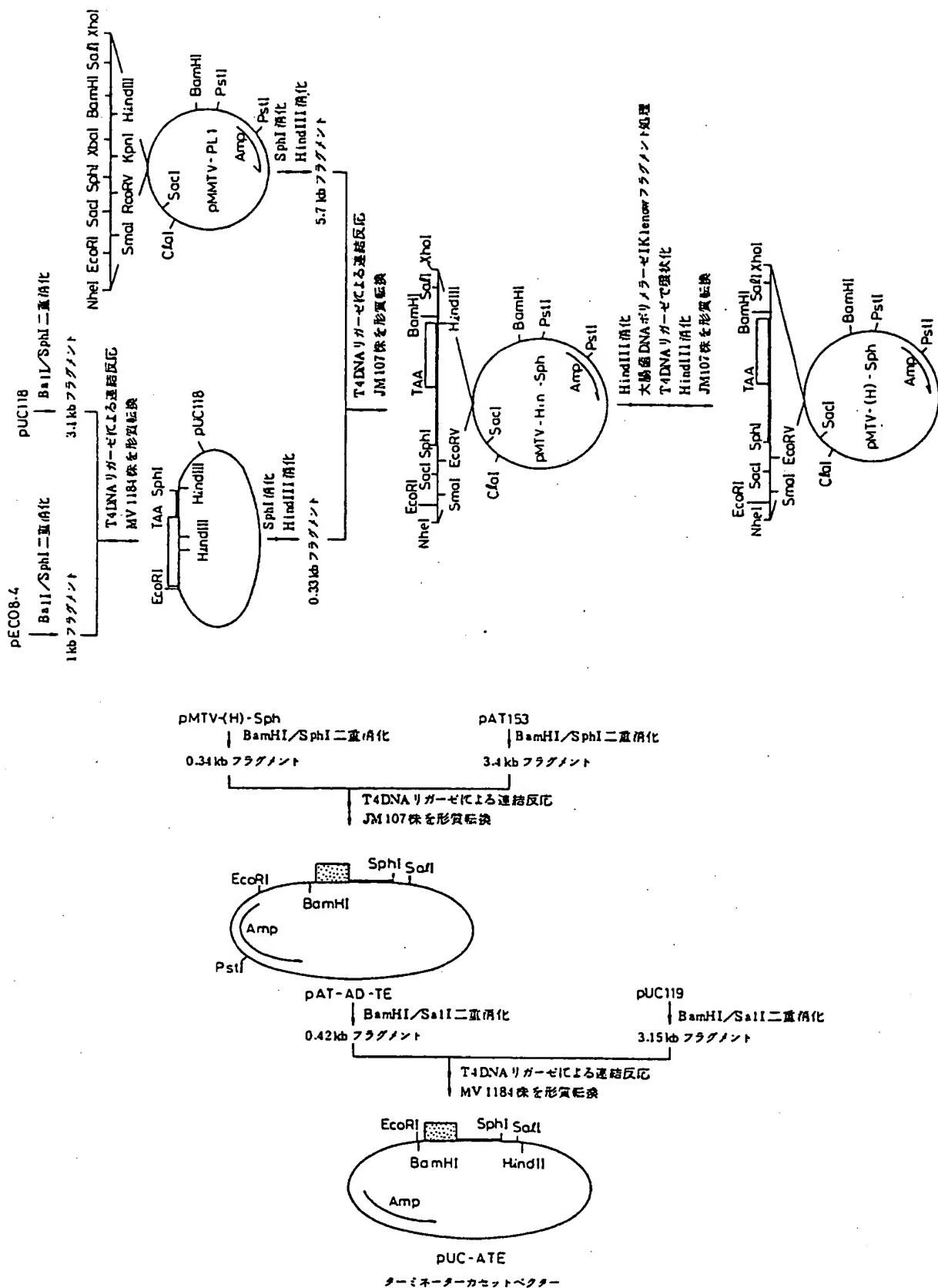


第3-2回

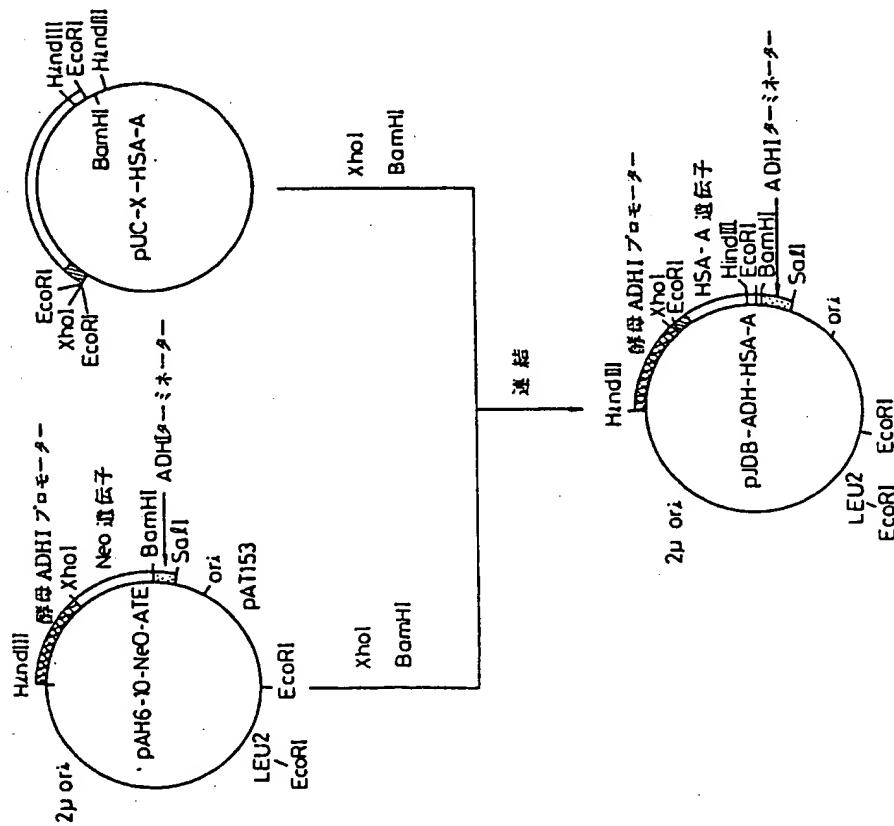
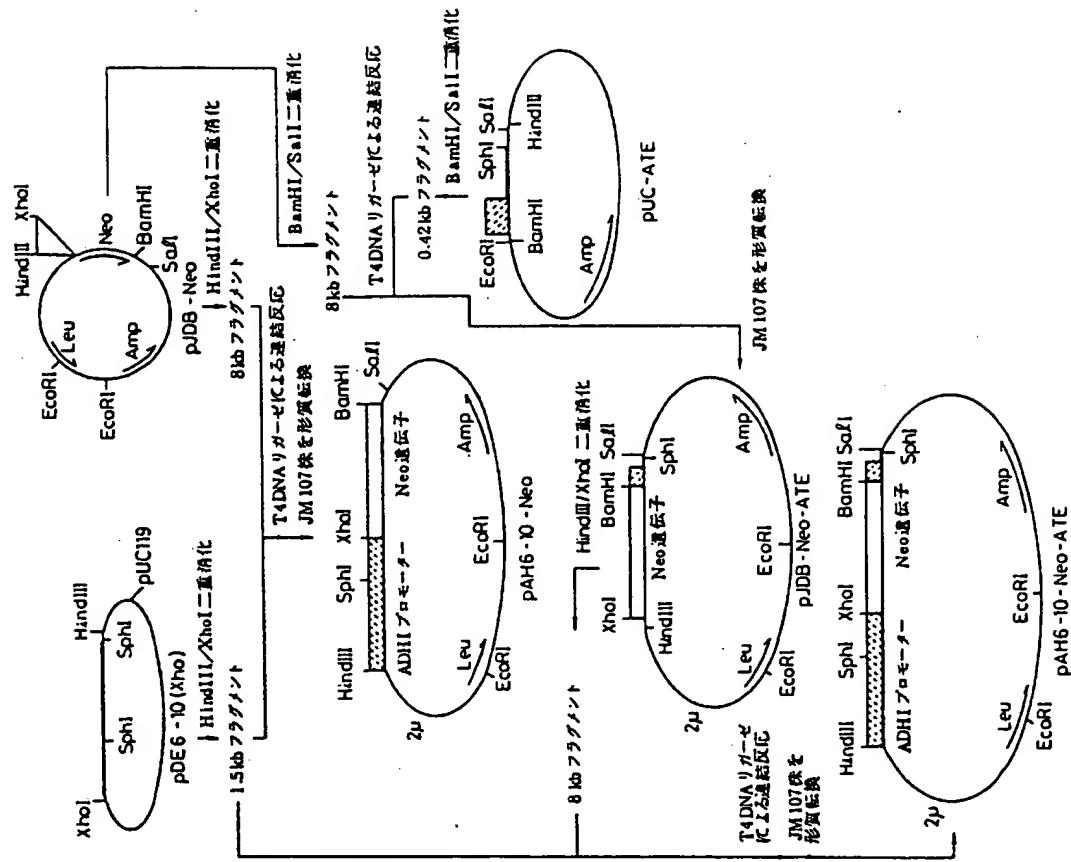


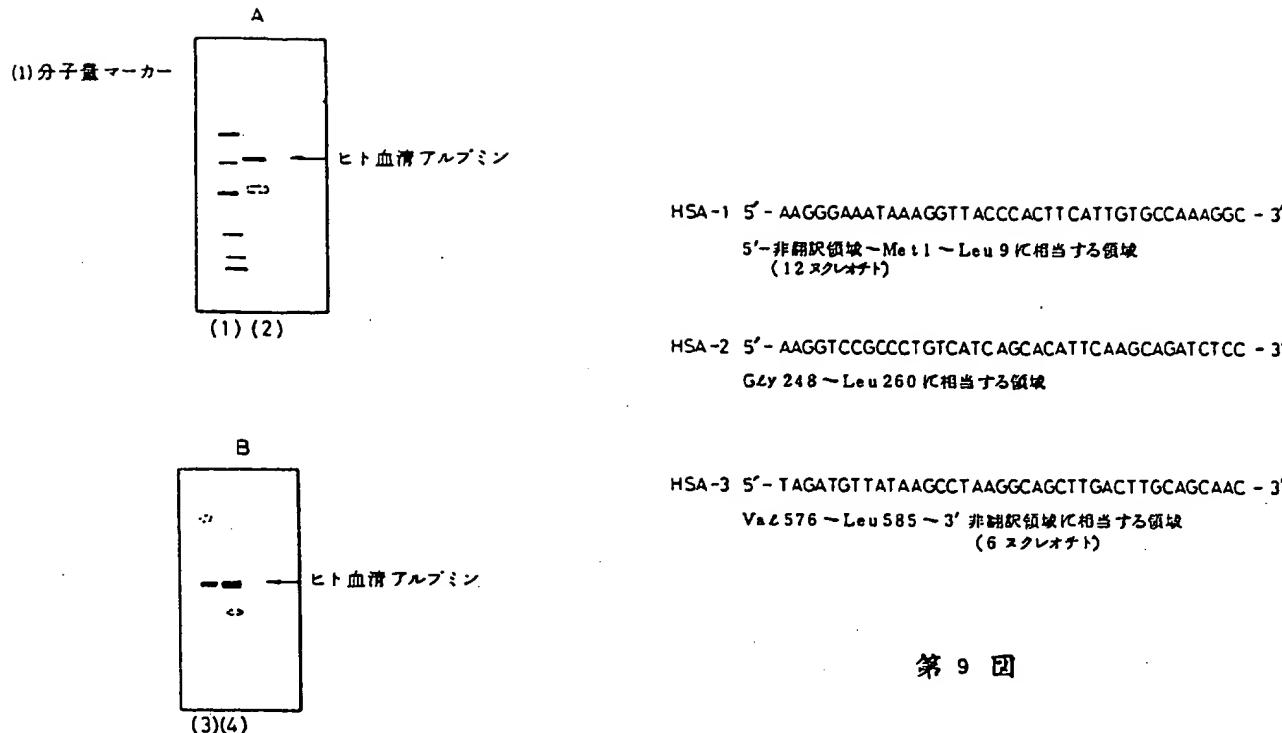
四
一
卷





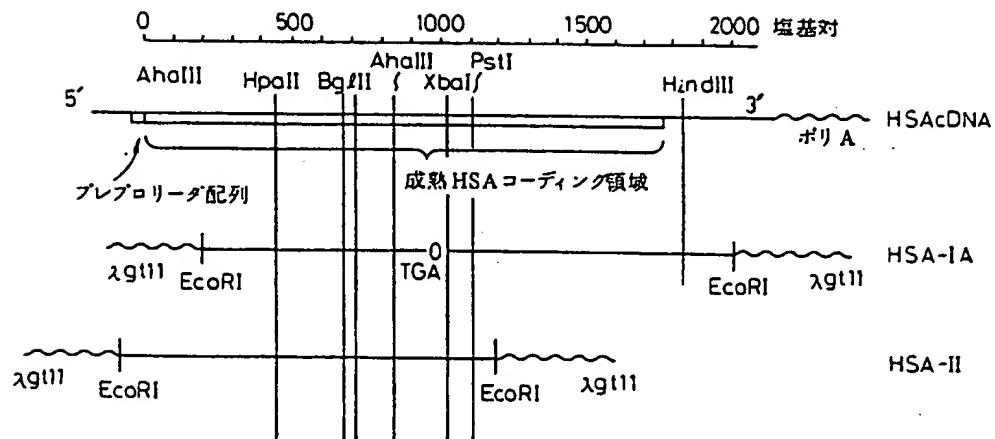
第4-2図



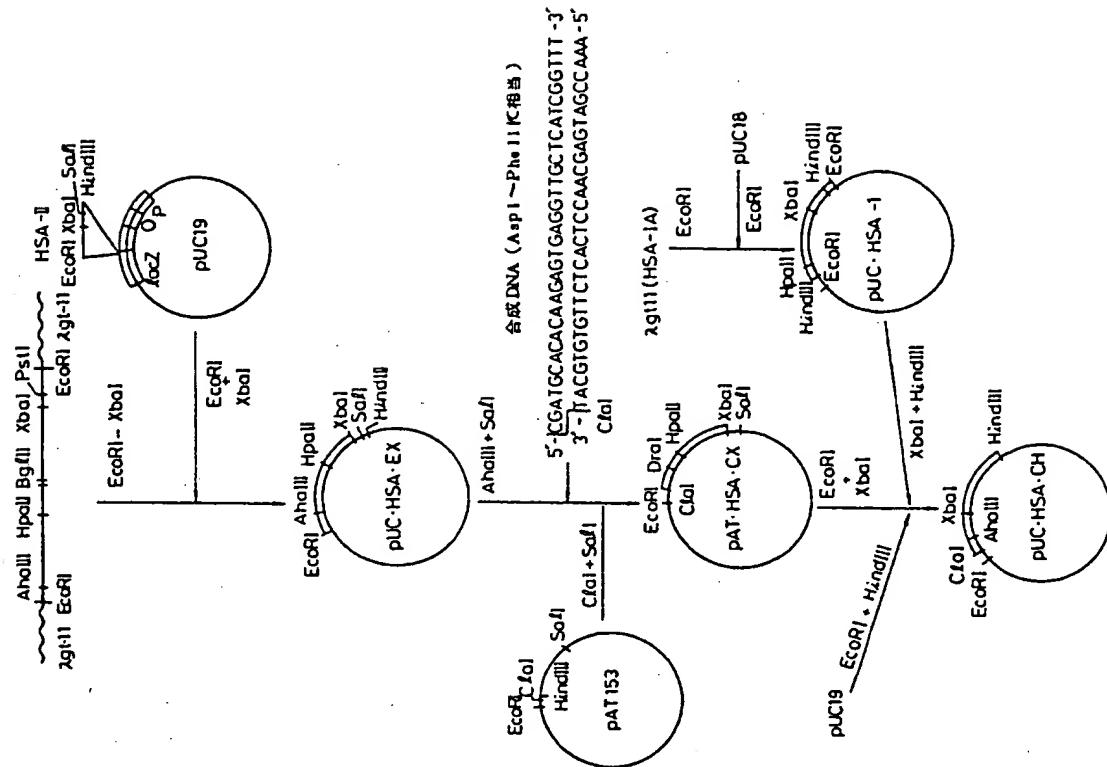


第 9 図

第 7 図



第 8 図



第 10 図

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile
GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT

50
Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala
GCC TTT GCT CAG TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTC AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT GCA.

Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys
AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC

100
Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu
ACA GTT GCA ACT CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA

Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr
TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT

150
Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr
GCT TTT CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT

Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala
GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT

200
Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAG TGT

第 11-1 図

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys
GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA

250

Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG

Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu
CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT TCG ATC TCC AGT AAA CTG

300

Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala
AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT TTG GAA AAA TCC CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT

Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val
GAC TTG CCT TCA TTA GCT GAT TTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG GAT GTC

350

Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala
TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG AGA CTT GCC

Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp
AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT

400

Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAT TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG

第11-2回

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu
TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTC CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTC GAG

450

Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu
GTC TCA AGA AAC CTA GGA AAA GTG GGC ACC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA

Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys
GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTC AGT GAC AGA GTC ACA AAA

500

Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys
TGC TGC ACA GAG TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA

Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys
GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA

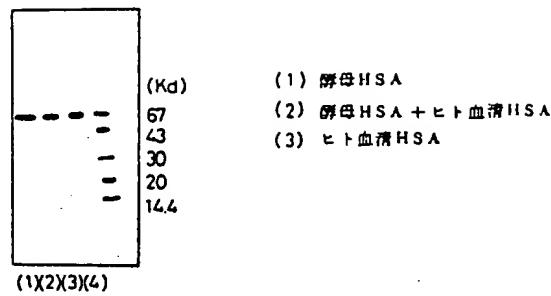
550

Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp
CAA ACT GCA CTT GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT

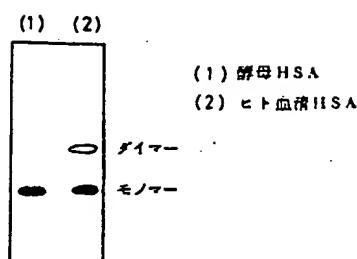
Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu
TTC GCA GCT TTT GTC GAG AAG TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GGT AAA AAA CTT

Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu End
GTT GCA AGT CAA GCT GCC TTA TAA

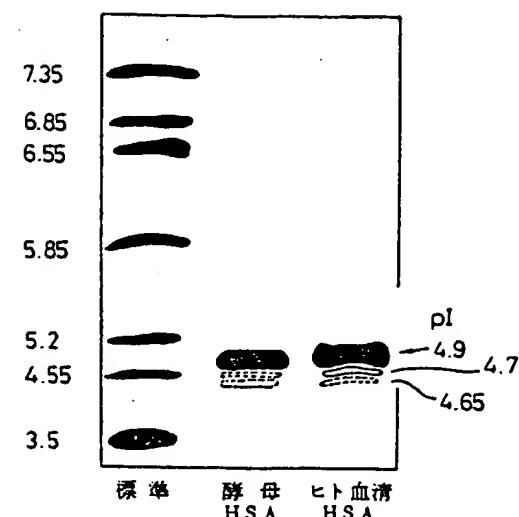
第11-3回



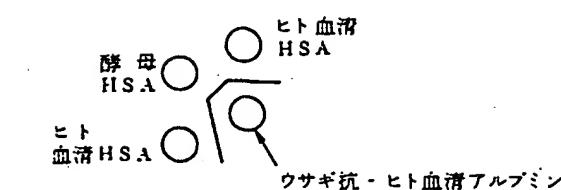
第 12 図



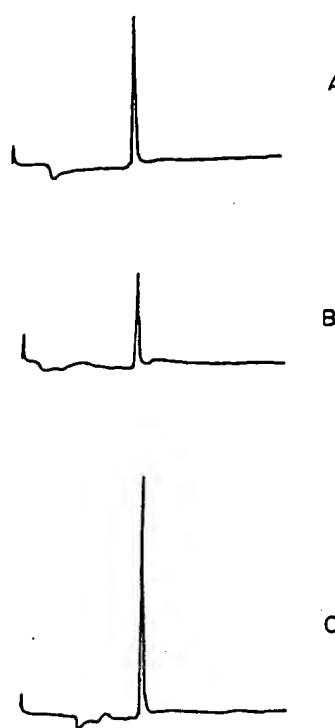
第 13 図



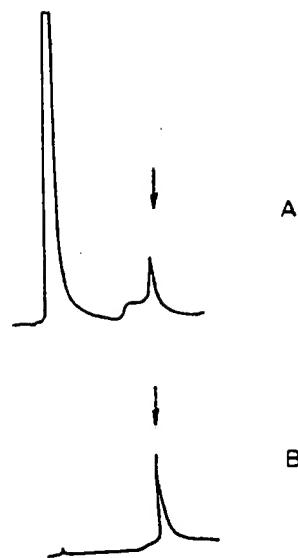
第 14 図



第 15 図



第 16 図



第17図

第1頁の続き

⑤Int. Cl.³ 識別記号 廈内整理番号
//(C 12 N 1/19
C 12 R 1:865)
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:865)

手 続 换 正 書 (自発)

平成1年2月9日

特許庁長官 吉田文毅

1. 事件の表示

昭和63年特許願第268302号

2. 発明の名称

酵母宿主によるヒト血清アルブミンAの製造

3. 换正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 東亜燃料工業株式会社

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目 8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士 (6579) 齊木 朗
(外4名)

方式
審査



5. 换正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の構

6. 换正の内容

明細書第43頁第5行目～8行目「このプラスミドを……寄託されている。」を削除します。